

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.**

**Defects in the images may include (but are not limited to):**

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## ②特許公報(B2)

平4-67957

④Int. Cl.<sup>1</sup>

識別記号

庁内整理 号

④④公告 平成4年(1992)10月29日

C 12 N 15/10  
// C 12 Q 1/68

A

8114-4B  
8828-4B

C 12 N 15/00

A

発明の数 1 (全29頁)

④発明の名称 核酸配列の増幅方法

④特 願 昭61-68857

④公 開 昭62-281

④出 願 昭61(1986)3月28日

④昭62(1987)1月6日

優先権主張 ④1985年3月28日④米国(US)④716975

④1985年10月25日④米国(US)④791308

④発 明 者 カリー バンクス マ アメリカ合衆国, カリフォルニア 94708, ケンジント  
リス ン, ベロイト アベニュー 447④出 願 人 エフ. ホフマン-ラ スイス国, 4002 バーゼル, グレンツアハーシュトラ-セ  
ロシュ アクチエンゲ 124  
ゼルシャフト

④代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名

審 査 官 佐 伯 裕 子

微生物の受託番号 ATCC 39698 ATCC 39699 ATCC 39700 ATCC CRL8756

1

2

## ⑥特許請求の範囲

1 同一の長さ又は異なる長さの2つの別個の相補的鎖から成る核酸又はその混合物中に含まれる少なくとも1種類の特定の核酸配列の増幅方法であつて、

(a) 前記鎖を、2以上のオリゴヌクレオチドプライマーにより処理して、増幅されるべき核酸配列について該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで、前記プライマーは、特定の核酸配列の鎖と実質的に相補的であり、且つ増幅されるべき核酸配列の両端を規定し、各プライマーから合成された伸長生成物とその相補体から分離された場合に更なる合成のための鋳型として機能することができるように選択され；

(b) 前記プライマー伸長生成物をそれらが合成された鋳型から分離して単鎖分子を生成せしめ；そして

(c) 段階(b)から生じた単鎖分子を段階(a)のプライマーにより処理して、段階(b)において生成した各単鎖分子を鋳型として用いてプライマー伸長生成物を合成する；

ことを含んで成る方法。

2 段階(b)及び(c)を少なくとも1回反復することを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の方法。

5 3 段階(b)を変性により、又は酵素ヘリカーゼを使用して行うことを特徴とする特許請求の範囲第1項又は第2項に記載の方法。

4 段階(b)及び(c)を重合誘導剤を使用して行なうことを特徴とする特許請求の範囲第1項～第3項のいずれかに記載の方法。

5 段階(a)及び/又は(c)を、Eコリ (E.coli) DNAポリメラーゼI、EコリDNAポリメラーゼIのKlenow断片、T4DNAポリメラーゼ、熱安定酵素又は逆転写酵素から選択された重合誘導剤を使用して行うことを特徴とする特許請求の範囲第1項～第4項のいずれか1項に記載の方法。

6 段階(a)及び(c)を4種類の異なるヌクレオシドトリホスフェートを用いて行うことを特徴とする特許請求の範囲第1～第5項のいずれか1項に記載の方法。

7 前記核酸がDNAであることを特徴とする特許請求の範囲第1項～第6項のいずれか1項に記

載の方法。

8 前記核酸がDNAであり、そして前記プライマーがオリゴデオキシリボヌクレオチド類であることを特徴とする特許請求の範囲第1項～第7項のいずれか1項に記載の方法。

9 プライマーの集合を各相補的鎖のために使用し、それらプライマーの1つは前記鎖と実質的に相補的であることを特徴とする特許請求の範囲第1項～第8項のいずれか1項に記載の方法。

10 段階(a)において使用される核酸の混合物が段階(c)において定義されるように生成される先行する増幅工程の生成物であることを特徴とする特許請求の範囲第1項～第9項のいずれか1項に記載の方法。

11 使用されるプライマーが先行する増幅工程で使用されたプライマーと異なることを特徴とする特許請求の範囲第1項～第10項のいずれか1項に記載の方法。

12 1のプライマーが、増幅されるべき特定の配列と相補的でなくとも1個のヌクレオチドを含有することを特徴とする特許請求の範囲第1項～第11項のいずれか1項に記載の方法。

13 段階(a)及び(c)におけるプライマーがそれぞれ少なくとも1000:1のプライマー:相補的鎖のモル比で存在することを特徴とする特許請求の範囲第1項～第12項のいずれか1項に記載の方法。

14 前記核酸が単鎖RNAまたは単鎖DNAから合成されることを特徴とする特許請求の範囲第1項～第13項のいずれか1項に記載の方法。

15 前記RNAがメツセンジャーRNAであることを特徴とする特許請求の範囲第14項に記載の方法。

16 前記増幅されるべき特定の核酸配列が複数の核酸の混合物中に含まれることを特徴とする特許請求の範囲第1項～第15項のいずれか1項に記載の方法。

17 前記増幅されるべき核酸配列が、最初により大きな核酸中に含有されていることを特徴とする特許請求の範囲第1項～第16項のいずれか1項に記載の方法。

18 前記プライマーの3'-末端が相補的でなくとも1つは前記鎖と実質的に相補的であることを特徴とする特許請求の範囲第1項～第17項のいずれか1項に記載の方法。

19 前記段階(a)及び(b)を熱安定性DNAポリメラーゼ酵素を用いて行うことを特徴とする特許請求の範囲第1項～第18項のいずれか1項に記載の方法。

20 前記段階(a)及び(c)におけるプライマーがそれぞれ少なくとも10<sup>6</sup>:1のプライマー:相補的鎖のモル比で存在することを特徴とする特許請求の範囲第1項～第19項のいずれか1項に記載の方法。

21 前記段階(b)及び(c)を少なくとも10回反復することを特徴とする特許請求の範囲第1項～第20項のいずれか1項に記載の方法。

22 前記特定の核酸配列が1本のRNA鎖と1本のcDNA鎖から成ることを特徴とする特許請求の範囲第1項～第6項及び第9項～第21項のいずれか1項に記載の方法。

23 前記プライマーの一方がプロモーターをコードしていることを特徴とする特許請求の範囲第1項～第22項のいずれか1項に記載の方法。

#### 20 発明の詳細な説明

本発明は、その存在する核酸配列を増幅するための方法に関する。より詳細には本発明は、与えられたDNA又はRNA配列から初期に存在する量に比較してより大量の任意の特定の核酸配列を生成せしめる方法に関する。該DNA又はRNAは単鎖又は二重鎖であつてもよく、比較的純粋な種であつても核酸の混合物の成分であつてもよい。本発明の方法では、所望の核酸配列の増幅を達成するために反応を繰り返し行うようにする。

#### 30 【従来の技術】

特に診断上の用途のためには、標的核酸配列は問題のDNA又はRNAのほんの僅かな部分であることがあり、非同位体標識又は末端標識オリゴヌクレオチドプローブを使用するのではその存在を検出することは困難である。プローブ検出システムの感度を向上させるために多くの労力が費やされているが、現在利用できる方法を用いて容易に検出できるに十分な量を得るために、標的配列を増幅するような研究は殆ど行われていない。

核酸を初めから、あるいは既存の配列から合成する方法がいくつかの文献に記載されている。これらの方法は、完全に特定された配列の与えられた核酸を大量に生産することを可能にするものである。

核酸を初めから合成する1つの既知方法は、ヌクレオシド誘導体からの核酸の有機合成を含むものである。この合成は溶液中又は固体担体上で行われる。有機合成の1つのタイプはリン酸トリエステル法であり、これは遺伝子断片又は短い遺伝子を調製するために利用される。リン酸トリエステル法では、オリゴヌクレオチドが調製され、次にこれは結合されてより長鎖の核酸を形成する。この方法は、S.A.ナーランクラにより、Meth. Enzymol. 68巻90頁(1979年)及び米国特許第435627号に開示されている、該特許は、ソマトスタチン遺伝子の合成とクローニングを開示している。

有機合成の第2のタイプはリン酸ジエステル法であり、これはトランスファーRNA遺伝子の調製に利用されている。この方法はE.L.ブラウンらによりMeth. Enzymol. 68巻109頁(1979年)に開示されている。リン酸トリエステル法と同じように、リン酸ジエステル法もオリゴヌクレオチドの合成を含み、これらが実質的に結合されて所望の核酸が形成される。

上記した初めからの合成法は核酸の長鎖を合成するために利用されるが、核酸を大量合成するための実用的方法ではない。両法とも労力と時間を消費し高価な装置と試薬を必要としかつ全体収率が低い。全体収率が低いのは、オリゴヌクレオチドの合成とそれらを結合する反応が非効率的であることに起因する。長鎖の核酸を合成する場合あるいは短鎖の核酸を大量に合成する場合でさえも、多くのオリゴヌクレオチドを合成し多くの結合反応を行うことが要求される。従ってこれらの方法は任意で所望の核酸を大量に合成するには実用的ではない。

初めに存在する少量の核酸から大量の核酸を生産する方法も存在する。これらの方法は好適な宿主系内での核酸のクローニングを含み、ここでは所望の核酸は宿主の形質変換に使用される好適なベクター中に挿入される。宿主が培養されるとベクターが複製され、所望の核酸のコピーが生産される。核酸断片のサブクローニングについては、T.マニアチスらにより、コールド・スプリング・ラボラトリーのMolecular Cloning 390-401頁(1982年)に簡単に記述されている。この技術については米国特許第4416988号及び4403036号に

も記述されている。

米国特許第4293652号に記載されている核酸の第3の合成法は、上述の有機合成と分子クローニング法を合わせたものである。該法では、所望の核酸配列を作り上げるのに必要な好適な数のオリゴヌクレオチドを初めに合成し、次にこれらを次の挿入の前に増殖により増幅されるベクターに挿入する。

〔発明が解決しようとする問題点〕

本発明は、この分子クローニング法に幾らかの類似性を有している。しかし本発明はいかなる生物の繁殖をも含まず、従って繁殖に伴って起こり得る危険や不都合を回避することができる。本発明は所望の核酸と関連しない核酸の合成を必要とせず、従って本発明によれば複雑な生物学的混合物からコストをかけて生成物を精製することも回避できる。

本発明はプライマーと重合試薬を用いて1種の核酸又は複数の核酸の混合物中に存在する1又は2以上の特定の核酸配列を増幅する方法に関する。プライマーは増幅されるべき配列の末端を定め、そして1つのプライマーの伸長生成物は、他のプライマーとハイブリダイズしたときに所望の特定の核酸配列の生成のための鋳型となり、又その逆も起こる。そしてこのプロセスは所定量の配列が生成するまで必要なだけ繰り返される。標的配列から大量の核酸を比較的短時間で生産するためには、本方法は上記の従来法より効率的であると期待される。本方法は核酸混合物に僅かしか含まれていない核酸種を増幅し、該種を効率的に検出するために特に有用である。

〔問題点を解決するための手段〕

さらに詳しくは、この発明は、核酸又は核酸混合物中に存在する少なくとも1種の特定の核酸配列を増幅する方法を提供し、この場合、各核酸は同じ長さ又は異なる長さの2つの別個の相補的な鎖から成り、そして前記の方法は、

(a) 前記鎖を、2以上のオリゴヌクレオチドプライマーにより処理して、増幅されるべき核酸配列について該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで、前記プライマーは、特定の核酸配列の鎖と実質的に相補的であり、且つ増幅されるべき核酸配列の両端を規定し、各プライマーから合成された伸長生成

物がその相補体から分離された場合に更なる合成のための鋳型として機能することができるように選択され;

(b) 前記プライマー伸長生成物をそれらが合成された鋳型から分離して単鎖分子を生成せしめ;そして

(c) 段階(b)から生じた単鎖分子を段階(a)のプライマーにより処理して、段階(b)において生成した各単鎖分子を鋳型として用いてプライマー伸長生成物を合成する;

ことを含んで成る。

これらの段階は逐次的に又は同時に行うことができる。さらに、段階(b)及び(c)は配列の所望のレベルの増幅が得られるまで反復することができる。

この発明は、完全に特定された配列の既存の核酸を多量に製造するためのみならず、存在することは知られているがしかし完全には特定されていない核酸配列を製造するためにも有用である。いずれの場合にも、増幅されるべき配列の最初のコピーは入手可能でなければならない。但しそれは純粋である必要はなく、又は別個の (discrete) 分子である必要はない。

〔具体的な説明〕

プライマー、プローブ、検出すべきオリゴマー断片、オリゴマー対照体、及び標識されていないプロッキングオリゴマーに関して使用される「オリゴヌクレオチド」という用語は、2又はそれ以上の好ましくは3より多くのデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドから成る分子として定義される。その正確な大きさは多くの因子に依存し、その因子はオリゴヌクレオチドの究極的な機能と用途に依存する。

ここで使用される「プライマー」という用語は、精製された制限消化物として自然に存在しあるいは合成的に調製されたオリゴヌクレオチドを意味し、このプライマーは、例えば好適な温度及びpHでヌクレオチドとDNAポリメラーゼのような重合試薬が存在するような核酸鎖に相補的なプライマーの伸長生成物の合成が誘発される条件下に置かれたときに合成開始点として機能することができる。該プライマーは増幅効率を最大にするため単鎖であることが好ましいが、その代わりに二重鎖であつてもよい。二重鎖であると、プライ

マーは伸長生成物を調製するために使用される前にまずその鎖を分離するために処理される。プライマーはオリゴデオキシリボヌクレオチドであることが好ましい。プライマーは、重合試薬の存在下で伸長生成物の合成を開始するために十分な長さでなければならない。プライマーの正確な長さは、温度やプライマー源を含む多くの因子に依存する。例えば、目的とする配列の複雑さに依存してオリゴヌクレオチドプライマーは典型的には15から5又はそれより多くのヌクレオチドを含むが、より少ないヌクレオチドを含むものであつてもよい。短いプライマー分子は、鋳型とともに十分安定なハイブリッド複合体を形成するために、より低い温度を要求する。

プライマーは増幅されるべき各特定の配列の異なる鎖と「実質的」に相補的であるように選択される。このことはプライマーはそれぞれの鎖とハイブリダイズするに十分に相補的でなければならないことを意味する。従つてプライマーの配列は鋳型の配列を正確に反映する必要はない。例えば相補的でないヌクレオチド断片を、プライマーの配列の残部が鎖に相補的であるようにプライマーの5'末端に結合させてもよい。代わりに、プライマーの配列が増幅されるべき鎖の配列と十分な相補性を有してそれらとハイブリダイズし、それによつて他方のプライマーの伸長生成物合成鋳型を形成するならば、相補的でない塩基又はより長い配列がプライマー内に散在していてもよい。

本発明で用いられる「制限エンドヌクレアーゼ」及び「制限酵素」という用語は、二重鎖DNAを特定の核酸配列又はその近傍で切断するような細菌性酵素を意味する。

本発明で用いられる「DNAの多形現象」という用語は、DNA中の特定の部位に2又はそれより多くの異なつたヌクレオチド配列が存在できる状態を意味する。

「制限断片長さの多形現象 (RALP)」という用語は、特定の制限エンドヌクレアーゼによる消化により形成される制限断片の長さに個体間の相違があることを意味する。

本発明は、核酸中に存在すると思われる1又はそれ以上の所望の特定の核酸配列を増幅する方法に関する。本法によれば大量の特定の配列を調製

できるので、本発明はDNA又はメッセンジャーRNAのクローニング効率を改良し、かつ標的配列を増幅してその検出を容易にするために使用することができる。この発明はまた、不完全な化学合成から生ずる核酸の混合物から所望の配列を多量に得るためにも有用である。

一般に、本発明の方法は、用いられる反応ステップの数に関連して指数的な収量で少なくとも1つの特定の核酸配列を生産する連鎖反応を含み、該配列は(a)必要とされる末端が、それとハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを合成できるに十分な程度に詳細に知られており、(b)連鎖反応を開始するために少量の配列が入手可能であることが条件となる。連鎖反応で得られる生成物は、使用した特定のプライマーの末端に対応する末端を有するような個別的な核酸のデュプレックスである。

精製された状態でも精製されていない状態でもよい任意の核酸源を、所望の特定の核酸配列を含むと思われるのであれば、出発核酸として使用できる。従って本法では、例えば単鎖であつても二重鎖であつてもよいDNA又はRNA例えばメッセンジャーRNAを使用することができる。更にそれぞれ1つの鎖を含むDNA-RNAのハイブリドを使用してもよい。これらの核酸の混合物を使用してもよく、又先行する増幅反応において同じか又は異なつたプライマーを用いて生産された核酸を使用してもよい。増幅すべき特定の核酸配列は大きな分子の一部であつてもよく、特定の配列が核酸全体を構成するようにはじめから個別的な分子として存在していてもよい。増幅すべき配列は初めから純粋な状態で存在する必要はなく、該配列は、複雑な混合物の小部分、例えば全ヒトDNA中の $\beta$ -グロビン遺伝子、又は特定の生物学的試料の極く僅かの部分のみを構成する特定の微生物に起因する核酸配列の部分であつてもよい。出発物質としての核酸は、同じか又は異なつた2以上の所望の特定の核酸配列を含んでいてもよい。従って本発明の方法は、1つの特定の核酸配列を大量に生産するだけでなく、同じか又は異なつた核酸分子上に位置する2以上の異なつた特定の核酸配列の同時増幅にも有用である。

核酸は、例えばpBR322のようなプラスミド、クローン化されたDNA又はRNA、又は細菌、酵

母、ビールス及び植物や動物などの高級生物等の自然にあるDNA又はRNA等の任意源から得ることができる。DNA又はRNAは、例えばマニアチスらにより Molecular Cloning の280から281頁 (1982年) に記載されているような種々の技術により、血や絨毛又は羊膜細膜等の組織物質から抽出することができる。

本発明方法により、任意の特定の核酸配列を生産することができる。配列の両末端の十分な数の塩基が十分詳細に分かつており、これにより所望の配列の異なるスライドに対し、かつ該配列に沿つた次のような相対位置にハイブリダイズする2つのオリゴヌクレオチドプライマーを調製することができる。すなわち、1つのプライマーから合成伸長した生成物が、鋳型(相補体)から分離されたときに、限定された長さの核酸に他のプライマーを伸長させるための鋳型としての役割を果たせばよい。配列の両末端の塩基に関する知識が増加するほど目的とする核酸配列のためのプライマーの特異性も大きくなり、従って本法の有効性も大きくなる。以後使用するプライマーという用語は、特に増幅すべき断片の末端配列に関する情報にいくらかの曖昧さがある場合には、1より大きい数のプライマーを意味するものと理解されるべきである。例えば、核酸配列が蛋白質配列の情報から推測できる場合、遺伝子コードの縮重に起因する全ての可能なコドン変化を示す配列を含むプライマーを集めて各鎖用として使用する。このような集合のうちの1つのプライマーは、増幅すべき所望配列の末端と一致する。

オリゴヌクレオチドプライマーは任意の好適な方法、例えば上記したリン酸トリエステル法及びリン酸ジエステル法又はそれらのオートメーション化された方法を使用して調製することができる。このようなオートメーション化された方法のうち1つによれば、ビューケーラにより Tetrahedron Letters 22巻1859-1862頁に記載されている通り、ジエチルフルオロアミグイトを出発物質として使用して合成することができる。修飾された固体担体上でのオリゴヌクレオチド合成の1つの方法が米国特許第4458066号に記載されている。生物源(例えば制限エンドヌクレアーゼ消化物)から分離したプライマーを使用することも可能である。

特定の核酸配列は、該配列を鋳型として含む核酸を使用して生産される。核酸が2つの鎖を含んでいるときは、別のステップとしてでもプライマーの伸長生成物の合成と同時でもよいが、該核酸は鋳型として使用される前に鎖を分離する必要がある。この鎖分離は、物理的、化学的及び酵素的の方法を含む任意の好適な変性法により行うことができる。核酸の鎖を分離する1つの物理的方法は、完全に(99%以上)変性されるまで核酸を加熱することを含む。典型的な加熱変性は80から150℃で1から10分間加熱することを含む。鎖の分離は、ヘリカーゼ、又はヘリカーゼ活性を有しリボATPの存在下でDNAを変性させるものとして知られる酵素RecAとして知られる酵素類からの1酵素により誘発させることもできる。ヘリカーゼで核酸の鎖を分離するのに好適な反応条件はクーン ホフマン ベーリングにより CSHQuantitative Biologyの43から63頁(1978年)に記載され、RecAを使用する技術は、Cラディングにより Ann.Rev.Geneticsの16巻405から437頁に記載されている。

増幅すべき配列を含む当初の核酸が単鎖であると、その相補体をそれに1つ又はつのオリゴヌクレオチドプライマーを加えて合成する。好適な単一プライマーが加えられると、プライマー、重合試薬及び後述する4つのヌクレオチドの存在下でプライマー伸長生成物が合成される。生成物は部分的に単鎖核酸と相補的で、核酸鎖とハイブリダイズして長さの異なるデュプレックスを形成し、これは上記した通り単鎖に分離され、相補的な2つの分離された鎖となる。代わりに2つの好適なプライマーを単鎖に加えて反応を行うこともできる。

当初の核酸が増幅すべき配列を構成するならば、プライマーの伸長生成物は当初の核酸の鎖と完全に相補的となり、ハイブリダイズして同じ長さの鎖から成るデュプレックスを形成し、これは分離されて単鎖の分子となる。

核酸の相補的な鎖が分離すると、当初の核酸が二重鎖であつても単鎖であつても、その鎖は他の核酸鎖の合成用鋳型として容易に使用することができる。この合成は任意の好適な方法を用いて行うことができる。通常それは好ましくはpHが7から9、最も好ましくは8である緩衝水溶液中で起

こる。好ましくは過剰のモル比(クローン化された核酸については、通常プライマー対鋳型が1000:1、そしてゲノムの核酸については通常プライマー対鋳型が10<sup>6</sup>:1)の2つのオリゴヌクレオチドプライマーを分離された鋳型鎖を含む緩衝水溶液中に加える。しかし本法を診断的用途に使用する場合には相補的な鎖の量は既知ではないことを理解すべきであり、従つて相補的な鎖の量に関連するプライマーの量を確信をもつて決定することはできない。しかし実際には、増幅すべき配列が複雑な長鎖の核酸鎖の混合物中に含まれる場合には、加えられるプライマーの量は相補的な鎖(鋳型)の量よりも通常モル過剰とする。本法の効率を改良するためには、大きな過剰モル比とすることが好ましい。

デオキシリボヌクレオシド三リン酸であるデオキシATP、デオキシCTP、デオキシGTP及びTTPの十分な量も合成混合物に加え、生成する溶液を約90-10℃で約1から10分、好ましくは1から4分間加熱する。この加熱時間の後、溶液の温度をプライマーのハイブリダイゼーションに好適な室温まで下げる。この冷却した混合物にプライマー伸長反応を誘導し又は触媒するための適当な薬剤(誘導試薬又は重合試薬と称する)を加え、従来知られている条件下で反応を行わせる。このの合成反応は、室温からそれを越えると重合試薬が効率的に機能しない温度までの間で行わせることができる。従つて例えばDNAポリメラーゼを重合試薬として使用するとき、温度を通常40℃以上に上昇させない。最も好ましくは反応は室温において起こる。

重合試薬(誘導試薬)は、プライマーの伸長生成物の合成を達成できるものならば、酵素を含むどのような化合物でも系でもよい。この目的のための好適な酵素は、例えばEコリーDNAポリメラーゼI、EコリーDNAポリメラーゼIのクレノー断片、T4DNAポリメラーゼ、他の入手できるDNAポリメラーゼ、逆転写酵素及び耐熱性酵素を含む他の酵素を含み、これらは好適な態様でのヌクレオチドの結合を促進し、各核酸鎖と相補的であるプライマーの伸長生成物を形成する。一般に合成は各プライマーの3'末端から始まり、合成が終了するまで鋳型鎖に沿つて5'末端方法に向かつて進行し、異なつた長さの分子を生

成する。しかし上述の方法と同じ方法を用いて5'末端で合成を始め、他の方法に向かつて反応を進行させる試薬がある。

新たに合成された鎖とそれと相補性を有する核酸鎖は、本法のその後のステップにおいて使用される二重鎖分子を形成する。次のステップでは、二重鎖分子の鎖は上述の任意の手順を用いて分離され、単鎖分子を提供する。

新たな核酸が該単鎖分子上で合成される。追加の誘導試薬、ヌクレオチド及びプライマーを、上記に規定した条件下で反応を進行させるために必要ならば加えてもよい。オリゴヌクレオチドプライマーの一端から再度合成が始まり、そして鋳型の単鎖に沿って進行して他の核酸を生成する。このステップの後における伸長生成物の半分は2つのプライマーが結合した特定の核酸配列から成っている。

鎖分離と伸長生成物合成のステップは、特定の核酸配列を所定量生産するまで必要なだけの回数繰り返すことができる。後により詳細に記載するように、特定の核酸配列は指数的に蓄積する。最初の核酸又は核酸の混合物から2以上の特定の核酸配列を生産することが望ましい場合は、好適な数の異なったオリゴヌクレオチドプライマーを使用する。例えば2つの異なった特定の核酸配列を生成する場合には、4つのプライマーを使用する。プライマーのうちの2つは特定の核酸配列のうちの1つに関するもので、他の2つのプライマーは第2の特定の核酸配列に関するものである。これにより、2つの異なった特定の配列が本法を用いて指数的に生産され得る。本発明は、各ステップ後に新しい試薬を加える段階的方法、又は全ての試薬を初期のステップで加える同時的方法、又はある与えられた数のステップの後に新しい試薬を加える一部段階的で一部同時的方法のいずれによつても行うことができる。熱処理のように重合試薬を不活性化する鎖分離方法を採用した場合には、熱に対して不安定である酵素の場合がそうであるように、各鎖分離ステップ後に重合試薬を補充することが必要である。ヘリカーゼのような酵素的手段を含む多数の精製された成分を鎖分離ステップで使用する場合は、同時的方法を使用することができる。同時的方法では、反応混合物は、所望の配列を含む核酸鎖の他に、鎖分離

酵素（例えばヘリカーゼ）、rATPのような鎖分離酵素への適切なエネルギー供給源、4つのヌクレオチド、モル過剰のオリゴヌクレオチドプライマー及びE.コリーDNAポリメラーゼIのクロー断片のような誘導試薬を含むことができる。同時的方法で変性のために熱を使用するときは、誘導試薬に依存するが好ましく65-90℃の高温で機能する熱安定性ポリメラーゼ等の熱安定性誘導試薬を使用し、この温度で核酸は平衡状態にある単鎖と二重鎖から成っている。長さの短い核酸には、約50℃程度の低温が採用される。どの程度の高温が使用できるかは、その温度で酵素が失活するかあるいはプライマーのハイブリダイゼーションが不十分な程度しか起こらないかどうかによって異なる。このような熱安定性酵素は、例えばA.S.カレディンらにより *Biokhimiya* 45巻644-651頁(1980年)に記載されている。本法の各ステップは、全ての試薬が始めから存在するにもかかわらず、続いて起こる。必要ならば追加の試薬を加えてもよい。適切な長さの時間が経過して所望量の特定の核酸配列が生成した後、任意の公知方法で酵素を失活させるか反応成分を分離するかして反応を停止させる。

本発明方法は連続的に行つてもよい。オートメーション化された方法の一態様として、反応を、変性区域、試薬添加区域及び反応区域を通つてサイクルさせるような方法がある。他の態様では、プライマーの伸長生成物の合成に使用する酵素をカラム中で固定化することができる。他の反応成分は連続するカラムと加熱用コイルを通るようにポンプを使つて連続的に循環され、これにより、生成した核酸が酵素を失活させることなく繰り返して変性される。

本発明の概略が下記に示され、ここでは相補的な鎖〔S<sup>+</sup>〕と〔S<sup>-</sup>〕から成る所望配列〔S〕を含む二重鎖DNAが核酸として使用されている。第1の及び引き続いて起こる反応サイクルでは、当初の鋳型上の各オリゴヌクレオチドプライマーの伸長は、プライマーの1つとともにのみ終了する制限のない長さの、1つの新しいssDNA分子生成物を生成する。以後「長鎖生成物」と呼ぶこれらの生成物は直線的に蓄積し、つまり任意数のサイクルの後に存在する量はサイクル数に比例する。



16

オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションにより形成される意図されない副生成物は、それ自身触媒活性がなく（稀な例を除く）、従つて直線的に蓄積する。

であり、もし〔S〕を含むDNA:

18

プライマー-2    5' AAAAAAAAAA —————→ 伸長の方向

3'....zzzzzzzzzzzzzzzzTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGG 5'

伸長の方向 ←———— GGCGGGCGGGG 5' プライマー 1

[illegible]

プライマー-2    5' AAAAAAAAAA —————→ 伸長の方

[illegible]

ここまで伸長 ←———— GGGGGGGGGG 5' プライマー1

5' AAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCZZZZZZZZZZZZZ..3'

上記4つのデブレックスが分離されると次の鎖が生ずる。

5' AAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCC 3'

### 新しく合成された[S<sup>+</sup>]

3' ....zzzzzzzzzzzzzzzzzzTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGG 5'

### 第1サイクルで合成された長い生成物1

**3' .....TTTTTCTTTTCTTTTCTTTT TTTTTTTTTTYYYYYYYYCGGGGCGGGG 5'**

## 新しく合成された長い生成物 1

**5' ....ZZZZZZZZZZZZZZZZZZAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCCZZZZZZZZZZ... 3'**

## 当初の鋳型鎖+

5' AAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCZZZZZZZZZZZZZZ...3'

## 新しく合成された長い生成物2

**3' ..zzzzzzzzzzzzTTTTTTTTTYYYYYYYGGGGGGGGGzzzzzzzzzzzz...5'**

## 当初の鋳型鋳一

3' TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGGGGGGGG 5'

### 新しく合成された[S<sup>-</sup>]

5' AAAAAAAAAAXXXXXXXXXXCCCCCCCCCZZZZZZZZZZZZ...3'

第1サイクルで合成された長い生成物2

100%であるとした場合のnサイクル後の理論的に存在する成分量を比較したものである。

### 0 から $n$ サイクル後の二重鎖の数

35	サイクル数	鋳型	長鎖生成物	特定配列(S)
	0	1	—	—
	1	1	1	0
	2	1	2	1
	3	1	3	4
40	5	1	5	26
	10	1	10	1013
	15	1	15	32752

40

19

サイクル数	鋳型	長鎖生成物	特定配列(S)
20	1	20	1048555
n	1	n	$2^n - n - 1$

単鎖の核酸を鋳型として使用すると、サイクル 5  
あたり 1 つの長鎖生成物が生成する。

本法は好適な発現ベクターに特定の核酸配列を  
挿入するためにクローン化するのに使用できる。  
該ベクターは適切な宿主生物を形質転換して標準  
的な組み換え体 DNA 技術により遺伝子生成物を 10  
生産する際に使用できる。

更に本法はインビトロの突然変異用として使用  
することができる。オリゴデオキシリボヌクレオ  
チドは増幅されるべき DNA 配列と正確に相補的  
である必要はない。これらは、ポリメラーゼ酵素 15  
や他に使用されるいずれかの誘導試薬によつて伸  
長されるために十分な程度に、鎖とハイブリダイ  
ズすることができればよい。使用するプライマー  
が最初の鋳型と正確に相補的でない場合のポリメ  
ラーゼ連鎖反応の生成物は鋳型よりむしろプライ  
マー配列を有し、これによりインビトロの突然変  
異を可能にする。引き続きサイクルでは、より似  
上のミスペアプライミングが必要とされないの  
で、この突然変異が減ることのない効率下で増幅  
される。このように生産された突然変異体は標準  
的な分子生物学的技術により適切なベクター中へ  
挿入され、変化した蛋白質を生産する能力等の変  
化した特質をこのベクターに与える。

上述した変化した DNA 配列を形成する方法は、  
より以上の配列変化を誘発させるために異なつた  
プライマーを使用して該変化した DNA に対して  
繰り返すことができる。この方法では、一連の突  
然変異配列が徐々に生成され、ここで、この一連  
のものに新しく加えられるものでは、最後のもの  
と僅かに異なることができるが、最初の DNA 源 35  
配列とは非常に大きく異なることができる。この  
方法では、非常に大きな mismatches の場合にプ  
ライマーが機能しないために単一ステップでは行  
うことのできない変化を、最終的には作り出すこ  
とができる。

更に、十分な量のプライマーが増幅される鎖に  
相補的である配列を含むのであれば、プライマー  
はその配列の一部として相補的でない配列を含む  
ことができる。例えば鋳型配列に相補的でない核

20

酸配列 (例えばプロモーター、リンカー、コード  
配列等) を、1 つ又は両方のプライマーの 5' 末端  
に結合させることができ、これにより増幅工程の  
生成物にこれを付加することができる。伸長プ  
ライマーを添加した後、相補的でない核酸挿入部  
を含む新しい鋳型の所望量を得るために十分な数の  
サイクルを実施する。これにより簡単な技術を用  
いて比較的短時間 (例えば 2 時間又はそれ以下)  
内に組合わされた断片を大量に生産することが可  
能になる。

本法は、伝染性疾患、遺伝子性疾患又は細胞性  
の疾患、例えば癌、と関連する特定の核酸配列、  
例えば発癌遺伝子、の検出及び/又は特徴付けを  
可能にするために使用される。増幅は、例えば胎  
児細胞から得られる DNA を用いる鎌状赤血球貧  
血の胎児診断等、分析に利用できる核酸の量が非  
常に小さい場合に有用である。増幅は、本来的に  
感度の良くない非放射性検出技術を用いて少量の  
試料を分析する場合、又は放射性技術を用いるが  
迅速な検出が望ましい場合に特に有用である。 20

本発明の目的のためには、遺伝子性疾患は、例  
えば鎌状赤血球貧血、囊胞性繊維症、 $\alpha$ -サラセ  
ミア、 $\beta$ -サラセミア等の、任意の生物体からの  
ゲノム DNA 中の特定の欠損及び/又は変異を含  
む。鎌状赤血球貧血は、本法による好適な DNA  
配列の増幅の後のオリゴマー制限分析又は RFLP  
状分析を経て容易に検出することができる。 $\alpha$ -  
サラセミアは配列が存在しないことにより検出  
することができ、 $\beta$ -サラセミアは疾患を起こさ  
せる変異に近接してリンクする多形性  
(polymorphic) 制限部位の存在により検出す  
ることができる。 25

これら全ての遺伝子性疾患は適切な配列を増幅  
し、それを放射性プローブを使用せずにサザンブ  
ロット法により分析して検出することができる。  
このような方法では、例えば非常に少量の所望配  
列を含む羊水からの DNA の少量の試料を増幅し、  
制限酵素で切断し、そしてサザンロット法で分  
析する。増幅シグナルをハイレベルとすることに  
より、非放射性標体を使用することが容易になる。  
40

他の態様では、少量の DNA を便利なレベルま  
で増幅し、次に更に伸長反応を行うが、この場合  
容易に検出できるヌクレオチド誘導體 (例えば

<sup>32</sup>P又はビオチンでラベルしたヌクレオチド三リン酸)を直接最終のDNA生成物に導入し、これを制限分析及び電気泳動分析あるいは任意の他の好適な方法を用いて分析する。この技術のモデル系の例を第5図に示してある。

第3図のモデル系に示した更に他の態様では、核酸は増幅の前に特定の制限エンドヌクレアーゼに暴露する。切断された配列は増幅できないので、予め制限酵素で処理したDNA試料の存在にもかかわらず増幅された断片が現れることは、増幅された配列中にエンドヌクレアーゼの部位がないことを暗示する。増幅された配列が存在するかどうかは適当な方法で検出することができる。

この技術の実際的な適用方法は、本明細書とサイキラによるBiotechnology3巻1008-1012頁に記載されているオリゴマー制限技術を用いて鎌状赤血球貧血の検出を容易にする使用により例示することができる。鎌状赤血球貧血はβ-グロビン遺伝子の第6コドンの1つの塩基対の変化により生ずるヘモグロビンの疾患である。第6図は多形現象 (polymorphism) 領域中の正常及び鎌状赤血球貧血のβ-グロビン遺伝子の配列を示すもので、一本線は正常遺伝子にのみ存在するDde I 部位の位置を示し、二本線は正常及び鎌状赤血球貧血対立遺伝子、の両方に存在する非多形性のHinf I 部位の位置を示す。第7図は両制限部位部位間にわたり星印で示された部分がラベルされているプローブを用いて正常のβ-グロビンDNAをオリゴマー制限開裂する方法を示すものである。前に記載したようにして増幅されたDNAが変性され、ラベルされたプローブとアニールされる。酵素Dde I はDNAを再構成されたDde I 部位で開裂させ、ラベルされたオクタマーを生じさせる。テストに使用した条件下では、オクタマーはデュプレックスから離れるのに十分な短さである。引き続き酵素Hinf I の添加は今や単鎖であるオクタマーに何の影響も与えない。第8図はβ-グロビンDNAの鎌状赤血球対立遺伝子に適用した前記と同じ方法を示す。酵素Dde I は、A-Aの塩基対がミスマッチしたものであるため、増幅されたDNAとラベルされたプローブとで形成されたデュプレックスを開裂させることはできない。しかし酵素Hinf I はハイブリッド制限開裂せしめ、ラベルされたトリマーが生成さ

れる。実際にはこの方法は、特定のシグナルがいずれかの対立遺伝子の存在と関連するので、個体のDNAが野性型のホモ接合体か、鎌状赤血球貧血型のホモ接合体か又は鎌状赤血球貧血形質を有するヘテロ接合体であるかを検診することができる。上述の方法を使用して適切な配列を増幅させることにより1つの<sup>32</sup>Pラベルのみを有するプローブを用いて単コピー遺伝子を迅速に分析することができる。

種々の伝染性疾患は、原因となる微生物に特異的である特定のDNA配列の臨床試料中で存在により診断することができる。これらはサルモネラ、クラミジア、ネisseria等の細菌、肝炎ウイルス等のウイルス、マラリアの原因となるプラスモジウム (Plasmodium) 等の寄生体を含む。フアルコーに与えられた米国特許第4358535号は、伝染性疾患の診断用の特別なDNAハイブリダイゼーションプローブの使用につき記述している。フアルコー法に固有の問題は、感染した患者からの臨床試料中には比較的少ない数の病原生物しか存在せず、これらから抽出されたDNAは試料中の全DNAの非常に小さな部分を構成するのみであるということである。DNA試料を固定化しハイブリダイゼーション検出する前に問題となっている配列を特異的に増幅することは、これらの方法の感度と特異性を大きく改良する。

伝染性疾患の診断用にDNAプローブを臨床的にルーチン化して使用することは、ワードのヨーロッパ特許第63879号に記載されているように非放射的にラベルされたプローブを使用するのならば、大いに簡略化される。この方法では、ビオチンを含むDNAプローブがアビジン又はビオチンに特異的な抗体に結合した色素体 (chromogenic) 酵素により検出される。この型の検出は便利であるが、比較的低感度である。本法による特異的なDNA増幅と安定にラベルされたプローブを組み合わせるにより、フアルコー及びワードの方法をルーチン化した臨床における有用な方法にするのに要求される便利さと感度を提供することができる。

この増幅工程は単一コピーのヒト遺伝子から十分な量のDNAを調製するのに利用することもでき、これにより臭化エチジウムのような簡単な非特異的なDNA染色によりそれを検出でき、直接

DNA診断を行うことができる。

伝染性疾患及び生物体のゲノム中の病原的異常性を検出するほか、本法は任意の病原状態と関連しないDNA多形現象（ポリモルフィズム）を検出するために使用することもできる。

次の実施例は例示のために提示するもので、どのようにも本発明を限定することを意図するものではない。これらの実施例で全てのパーセントは固体の場合は重量で、液体の場合は容量であり、他に指定がない限り温度は摂氏温度である。

#### 実施例 1

次のヌクレオチド配列を有する25塩基対配列

5'CCTCGGCACCGTCACCOCTGGATGCT3'  
3'GGAGCCGTGGCAGTGGGACCTACGA5'

（ATCCから得られるpBR322の47塩基対Fok I 制限断片に含まれる）を次のように調製した。47塩基対断片を含むpBR322のFok I 消化物を、供給者であるニューイングランド社の指示による条件に従ってpBR322Fok I で消化することにより調製した。使用したプライマーは、5'd (CCTCGGCACCG) 3' と 5'd (AGCATCCAGGGTG) 3'であり、通常の技術により調製した。25mMのリン酸カリウムと10mMの塩化マグネシウム、及び100mMの塩化ナトリウムから成る緩衝液（pH7.5）33μℓに2433ピコモルの上述の各プライマー、24ピコモルのpBR322のFok I 消化物、22ナノモルのデオキシATP、22ナノモルのデオキシCTP、19ナノモルのデオキシGTP及び10ナノモルのTTPを加えた。

混合物を85℃で分間加熱し、室温まで冷却した。EコリーDNAポリメラーゼIのクレノー断片の5単位を加え、温度を15分間維持した。その後再度85℃で5分間加熱し、冷却した。クレノー断片の5単位を再度加え、15分間反応を行った。加熱、冷却及び反応の各ステップを更に11回繰り返した。

最後の繰り返しの後、5μℓを反応混合物から取り出した。これを85℃で3分間加熱し、室温に冷却した。12.5ピコモルのα-P<sup>32</sup>デオキシシチジン三リン酸と5単位のクレノー断片を加え反応を15分間進行させた。ラベルされた生成物をポリアクリルアミドゲルの電気泳動で確認した。13サイクル後に見える強くラベルされたバンドのみ

が、意図する25塩基対配列であつた。

#### 実施例 2

増幅されるべき所望の配列は、ヒトのβ-グロビン遺伝子に含まれかつ鎌状赤血球貧血に関するMstII部位に伸びる94塩基対の配列であつた。該配列は第1図に示すヌクレオチド配列を有している。

#### I プライマーの合成

次の2つのオリゴデオキシリボヌクレオチドプライマーを下記する方法を用いて調製した。

5'CACAGGGCAGTAACG3'プライマーA、及び

5'TTTGCTTCTGACACA3'プライマーB  
オートメーション化された合成法

ビュウケージとカルサーズ法（Tetrahedron Letters22巻1859-1862頁（1981年）に従って合成したジエチルフオスフロアミダイトを、バイオサーチSAM-1を使用して制御した多孔ガラス担体から誘導したヌクレオシドへ次々と凝縮した。この方法は、ジクロルメタン中でのトリクロル酢酸による脱トリチル化と活性のある水素供与体としてベンゾトリアゾールを使用する縮合及びテトラヒドロフラン及びピリジン中での無水酢酸とジメチルアミノピリジンによるキヤツピングを含んでいた。1サイクルの時間は約30分であつた。各ステップの収率は実質的に当量的であり、脱トリチル化の間に解離するジメトキシトリチルアルコールを集め分光器による検査で決定した。

オリゴデオキシリボヌクレオシドを脱保護し、精製する方法

固体担体をカラムから取り出し、1mlの濃水酸化アンモニウムに閉鎖管中室温で4時間曝した。担体を濾過で取り除き、一部が保護されたオリゴデオキシリボヌクレオチドを含む溶液の温度を55℃に上昇させ、5時間維持した。アンモニアを取り除き、残渣を調製用ポリアクリルアミドゲルに適用した。30ボルト/cmで90分間電気泳動を行い、生成物を含むバンドを蛍光プレート上のUVシャドウイングで同定した。該バンドを切り取り、1mlの蒸留水で一晩かけて4℃で溶出した。この溶液をアルテックRP18カラムにかけ、pH6.0の1%酢酸アンモニウム緩衝液中7-13%のアセトニトリルで溶出した。この溶出液は260nmの紫外吸収でモニターし、適切なフラクションを集

め、固定した量での紫外吸収で定量分析し、かつ室温下で減圧遠心機中で蒸発させ乾燥した。

オリゴデオキシリボヌクレオチドの特徴付け

精製したオリゴヌクレオチドのテスト溶液をポリヌクレオチドキナーゼ及び $\gamma^{32}\text{P}$ -ATPで $^{32}\text{P}$ ラベルした。このラベルした化合物を50ボルト/cmで45分間電気泳動にかけた後、14-20%のポリアクリルアミドゲルのオートラジオグラフィーで確認した。この方法では分子量を確認することができる。ヘビ毒ジエステラーゼと細菌性アルカリフォスファターゼを使用してオリゴデオキシリボヌクレオチドをヌクレオシドに消化し、そして次は逆相HPLCカラム、並びに10%アクリロニトリル及び1%酢酸アンモニウム移動相を使用して、誘導されたヌクレオシドを分離し定量することにより塩基組成を決定した。

## II DNA源

### A 全ヒト野性型DNAの抽出

正常の $\beta$ -グロビンのヒトゲノムDNAホモ接合体を、ステットラーらによりProc.Nat.Acad.Sci.の72巻5966-5970頁に記載された技術を用いてセルラインMolt4(ヒューマン・ジエネティック・ミュータント・セル・レポジトリから入手し、GM2219cと同定した)から抽出した。

### B クローン化したグロビン遺伝子の造成

正常の $\beta$ -グロビン遺伝子の1.9kbのBamHI断片をコスミドpEC11から分離し、pBR322のBamHI部位に挿入した(ソベロンらのGene 9巻287-305頁(1980年))。合成40塩基対プローブとハイブリダイズする領域を含むこの断片は、第1及び第2のエクソン、第2のイントロン、並びに遺伝子の5'のフランキング(flancking)配列を含む(ローンらのCell15巻1157-1174頁)。このクローンはpBR328:HbAと名付けられ、ATCC第39698号として1984年5月25日に寄託された。

$\beta$ -グロビンの鎌状赤血球貧血対立遺伝子の対応する1.9kbのBamHI断片はコスミドpF12から分離され、上述の通りクローン化された。このクローンはpBR328:HbSと名付けられ、ATCC第39699号として1984年5月25日に寄託された。

各組み換えプラスミドをEコーリー-MM294(ATCC第39607号)へ形質変換し、そして増殖せしめた。

### C クローン化されたグロビン遺伝子のMstIIに

よる消化

それぞれの全量が100 $\mu\text{g}$ であるpBR328:HbAとpBR328:HbSを単独で20単位のMstII(ニューイングランドバイオラブ社)とともに16時間37 $^{\circ}\text{C}$ 、150mMのNaCl、12mMのTris HCl(pH7.5)、12mMのMgCl<sub>2</sub>、1mMのジチオスレイトース(DTT)及び100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のウシ血清アルブミン(BSA)中で消化した。生成物はそれぞれpBR328:HbA/MstII及びpBR328:HbS/MstIIと名付ける。

### III ポリメラーゼの連鎖反応

60mM酢酸ナトリウム、30mMトリス-アセテート及び10mM酢酸マグネシウムを含むpH8.0の緩衝液100 $\mu\text{l}$ へ100ピコモルのプライマーA(d(CACAGGGCACTAACG)の配列)、100ピコモルのプライマーB(d(TTTGCTTCTGACACA)の配列)及び1000ピコモルのデオキシATP、デオキシCTP、デオキシGTP及びTTPを含む2 $\mu\text{l}$ の溶液を加えた。上述した、下記のDNA源を加えた。

10 $\mu\text{g}$ の全ヒト野性型DNA(反応I)

0.1ピコモルのpBR328:HbA(反応II)

0.1ピコモルのpBR328:HbS(反応III)

0.1ピコモルのpBR328:HbA/MstLL(反応

25 IV)

0.1ピコモルのpBR328:HbB/MstII(反応V)  
非標的DNA(反応VI)

得られる各溶液を100 $^{\circ}\text{C}$ で4分間加熱し2分間で室温まで冷却し、その後Eコーリー-DNAポリメラーゼのクロー断片の4単位を含む1 $\mu\text{l}$ を加えた。各反応は10分間行い、その後プライマー、ヌクレオチド及びDNAを加え、加熱し、冷却し、ポリメラーゼを加え、そして反応させるサイクルを反応Iについては19回、反応II-VIについては4回繰り返した。

第1サイクルの前、及び各反応の最後のサイクルの後で取り出された反応I及びIIのアリコート4マイクロリットルを、pH8.3の0.089Mトリス-硼酸塩緩衝液中で、2.5mMEDTA中で、12%ポリアクリルアミドゲルに加えた。このゲルを25ボルト/cm、4時間電気泳動させ、固相担体として機能するナイロン膜へ移し、そして、pH7.4で30%のフォルムアミド、3xSSPE、5xデンハルツ及び5%のドデシル硫酸ナトリウム中で、標準的技術

を用いて調製した次式：



の<sup>32</sup>Pでラベルされた40塩基対の合成断片で検知した。第2図は、反応I及びII用の検知されたナイロン膜のオートラジオグラフである。レーン1は0.1ピコモルの58塩基対の対照合成断片で、そのうちの1つの鎖は上記プローブと相補的である。レーン2は第1の増幅サイクルの前の4μℓの反応Iの液である。レーン3は20回の増幅サイクル後の4μℓの反応Iの液である。レーン4は5回の増幅サイクル後の4μℓの反応IIの液である。レーン5はμ-<sup>32</sup>P-デオキシNTP及びポリメラーゼでラベルされたpBR322(ニューイングランドバイオラブ社)のFok I(ニューイングランドバイオラブ社)から成る分子量標準である。レーン3は、20サイクル後反応混合物Iは適切な分子量を有する特定の配列を大量に含み、他の検出できる生成物がないことを示している。5サイクル後の反応混合物IIもレーン4に示す通り出発物質である核酸と他の生成物の他にこの生成物も含んでいる。

5サイクル後の反応IIからVIの液5.0μℓに上述の各プライマー5ピコモルを加えた。溶液を4分間100℃に加熱し室温へ戻した。それぞれ3ピコモルのα-<sup>32</sup>P-デオキシATP、α-<sup>32</sup>P-デオキシCTP、α-<sup>32</sup>P-デオキシGTP及びα-<sup>32</sup>P-TTP、並びに4単位のクレノー断片を加えた。最終的な容積が10μℓであり塩濃度が上記した通りである反応を10分間行わせた。ポリメラーゼ活性は60℃で20分間加熱すると失われた。反応II-VIの反応液4μℓを、0.089Mトリス硼酸塩緩衝液、25mMEDTA中で12%ポリアクリルアミドゲルに加えた。このゲルを25ボルト/cm、4時間電気泳動させ、その後オートラジオグラフ処理した。

第3図は、電気泳動のオートラジオグラフである。レーン1は分子量標準、レーン2は反応II、レーン3は反応III、レーン4は反応IV及びレーン5は反応Vである。対照としてのDNAを伴わない反応VIのレーンはレーンのどこにもイメージを有さない。図から、標的DNAから予想される94塩基対断片は、無傷のβ-グロブリンDNA配列が増幅用に使用できるときのみ存在できることが分かる(つまりレーン2のpBR328:HbA、レ

ーン3のpBR328:HbS及びレーン5のpBR328:HbS/MstII)。MstIIによる消化はpBR328:HbAを94塩基対配列中で切断し、それを増幅できないようにし、94塩基対のバンドはレーン4に現れない。これに対し、pBR328:HbSの94塩基対配列はプラスミドがMstIIで消化されても切断せず、従って第5図に示すように増幅に利用できる。

第4図は94塩基対配列を増幅する3サイクルの連鎖反応を示すものである。PCO1とPCO2はプライマーA及びBである。右の数はサイクルを示し、左の数は特定の分子が生産されたサイクル数を示す。

#### 実施例 3

本実施例は、ヒトヘモグロビン遺伝子中の対立遺伝子MstII部位を含む110塩基対配列の増幅を示ものである。

プライマーは実施例2の技術で調製されたものである。1.0マイクログラムの全ヒトDNA、100ピコモルのd(ACACAACTGTGTTCACTAGC)及び100ピコモルのd(CAACTTCATCCACGTTCCACC)を以下のような100μℓの溶液に溶解させた。

1.5mM各4つのデオキシリボヌクレオシド三リン酸

30mM pH7.9のトリスアセテート緩衝液

60mM 酢酸ナトリウム

10mM 酢酸マグネシウム

25mM ジチオスレイトール

この溶液を100℃で1分間加熱し、迅速に25℃に下げて1分間加熱し、その後DNAポリメラーゼのクレノー断片2.5単位を加えた。ポリメラーゼの反応が25℃で2分間行い、その後加熱、冷却、クレノー断片の添加及び反応を望むだけ繰り返した。

各サイクルの効率が70℃で、15サイクル行つて、β-グロブリン遺伝子の所望の110塩基対断片1.4フェトモルを合成した。

#### 実施例 4

本実施例は、ヒトヘモグロビン遺伝子の対立遺伝子中のMstII部位を含む240塩基対配列の増幅

29

を示すものである。この配列は、Mco I、Hinf I 及び Mst II 制限部位を含んでいる。

pHが8.0で、60mM酢酸ナトリウム、30mMトリスアセテート及び10mM酢酸マグネシウムの混合物 (0.1ピコモルのpBR328:HbAを含む) に、

100 ピ コ モ ル の d  
(GGTTGGCCAATCTACTOCCAGG) プライマー、

100 ピ コ モ ル の d  
(TAACCTTGATACCAACCTGCCC) プライマー、

各1000ピコモルのデオキシATP、デオキシCTP、デオキシGTP及びTTPを含む2 $\mu$ lの溶液Aを加えた。

2つのプライマーは実施例2に記載した技術で調製した。溶液を100°Cで4分間加熱し、空气中で2分間冷却し、その後Eコリー-DNAポリメラーゼのクレノー断片4単位を含む液1 $\mu$ lを加えた。反応を10分間進行させ、その後溶液Aの添加、加熱、冷却、ポリメラーゼの添加及び反応からなるサイクルを3回繰り返した。反応液5.0 $\mu$ lに、上記の各オリゴヌクレオチドプライマー5ピコモルを加えた。溶液を10°Cで4分間加熱し、室温まで下げ、その後それぞれ3ピコモルの $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ラベルされたデオキシリボヌクレオシド三リン酸及び4単位のクレノー断片を加えた。最終的な容量が10 $\mu$ lで塩濃度が上記の通りである反応を10分間進行させる。ポリメラーゼ活性は60°Cで20分間加熱すると失活した。2 $\mu$ lのアリコートにNco I、Hinf I 及び Mst II で消化し、pH8.3の0.089Mトリスアセテート緩衝液、0.25mMEDTA中で12%ポリアクリルアミドゲルに加えた。ゲルを25ボルト/cmで4時間電気泳動させ、オートラジオグラフ処理した。第5図は電気泳動のオートラジオグラフを示し、ここでレーン1は分子量標準、レーン2は酵素の消化を伴わないもの (無傷の240塩基対)、レーン3はNco I による消化 (131及び109塩基対)、レーン4はMst II による消化 (149及び91塩基対)、そしてレーン5はHinf I による消化 (144及び96塩基対) である。オートラジオグラフは240塩基対反応の増幅したものと一致する。

#### 実施例 5

本実施例は、逐次的消化による鎌状赤血球貧血

30

を検出するための本発明の方法の使用を示すものである。

オリゴデオキシリボヌクレオチドの合成及びリン酸化

5\*

CTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGOCGTTA  
CTGOCCTGTGGG3' の配列のラベルされたDNAプローブ (\*がラベルを意味する) RS06、及びRS06と3つの塩基対がミスマッチしている。

3'GACAGAGGTCACCTCTTCAGACGGCAA  
TGACGGGACACCC5' の配列のラベルされていないブロックオリゴマーRS10を、実施例2(1)の方法に従って合成した。プローブRS06は、その5ピコモルを、70mMトリス緩衝液 (pH7.6)、10mM MgCl<sub>2</sub>、1.5mMスベルミン及び2.5mMジチオスレイトールを含む反応容量40 $\mu$ l中の4単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼ (ニューイングランドバイオラブ) 及び50ピコモルの $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (ニューイングランドニュークレア、約7200Ci/mM) と接触させることによりラベルした。全容量を25mMEDTAで100 $\mu$ lに調節し、トリス-EDTA (TE) 緩衝液 (10mMトリス緩衝液、0.1mMEDTA、pH8.0) により平衡化されたバイオラッド製の1mlのBio Gel P-4 スピン透析カラム上でマニアテイスらが Molecular Cloning 464-465頁 (1982年) に記載している方法に従って精製した。ラベルされたプローブは、トリス-硼酸-EDTA (TBE) 緩衝液 (89mMトリス、89mM硼酸、2.5mMEDTA、pH8.3) 中18%のポリアクリルアミドゲル (19:1のアクリルアミド:BISとバイオラッド) 上で500vhrにて電気泳動してさらに精製した。オートラジオグラフによる位置きめの後、ラベルされたプローブを含む部分を切り取り、粉碎し、0.2mlのTE緩衝液中へ一晩かけて4°Cで溶出させた。反応生成物のTCA沈殿は比活性が4.9Ci/ミリモルであり、最終的濃度が20ピコモル/mlであることを示している。

ラベルされないRS10ブロッキングオリゴマーは、200ピコモル/mlの濃度で使用した。

細胞系からのヒトゲノムDNAの分離

実質的にステットラーらの PNAS 79巻5966-5970頁 (1982年、M It4について) に記載の方法



及びマニアティスらのMolecular Cloning 280-281頁(1982年)に記載の方法を使用して、Molt4、SC-1及びGM2064のリンパ球系から高分子のゲノムDNAを分離した。

Molt4(ヒューマン・ミュータント・セル・デ  
ボジトリー, GM2219C)は正常の $\beta$ -グロビン  
についてホモ接合体のT細胞系であり、そして  
ATCC1985年3月19日に寄託されたSC-1は鎌  
状赤血球貧血対立遺伝子についてホモ接合体の  
EBVで形質変換されたB細胞系である。10  
GM2064(ヒューマン・ミュータント・セル・デ  
ボジトリー, GM2064)は胎児ヘモグロビンの遺  
伝的な永続性(HPFH)についてホモ接合体で  
ある個体当初単離され、 $\beta$ -又は $\delta$ -グロビン遺  
伝子配列を含んでいない。全て細胞系は10%の牛  
胎児血清を含むRPMI-1640中に維持された。  
臨床血液試料からのヒトゲノムDNAの単離

既知の鎌状細胞キヤリヤー(AS)からのCH12  
と名付けられた臨床血液試料をカルフォルニア州  
オークランドの小児病院のベルトラム・ルビン博  
士から得た。ヌンベルグらのProc. Nat. Acad. Sci.  
75巻5553-5556頁(1978年)に記載されている方  
法の変法を使用して、主に末梢の血液リンパ球か  
ら成るパフィーコート部分からゲノムDNAを調  
製した。

細胞を、5mlのトリス-EDTA-NaCl  
(TENN)緩衝液(pH 8の10mMトリス、pH 8、  
1mMEDTA、10mMNaCl)中に再懸濁し、  
0.2mg/mlのプロテイナーゼ、0.5%のSDSに調節  
し、そして37°Cで一晩インキュベートした。過塩  
素酸ナトリウムを0.7Mに加え、そして細胞溶解  
物を室温で1-2時間穏やかに振とうした。細胞  
溶解物をフェノールとクロロフォルムの1:1混  
合物30mlで抽出し、続いてクロロフォルム30ml  
で抽出し、次にエタノールで核酸を沈殿させた。  
ペレットを2mlのTE緩衝液に再懸濁させ、  
RNaseを0.005mg/mlに加えた。37°Cで1時間消  
化させた後、DNAを同量のフェノール、フェノ  
ール/クロロフォルム、及びクロロフォルムでそ  
れぞれ一度ずつ抽出し、エタノールで沈殿させ  
た。DNAを0.5mlのTE緩衝液に再懸濁させ、  
260nmの吸収により濃度を決定した。

$\beta$ -グロビン配列を選択的に増幅するための  
ポリメラーゼ連鎖反応

2マイクログラムのゲノムDNAを、10mMト  
リス緩衝液(pH 7.5)、50mMNaCl、  
10mMMgCl<sub>2</sub>、150ピコモルの配列

d(CACAGGGCACTAACG)のプライマーA、  
及び配列

d(CTTTGCTTCTGCACA)のプライマーBを  
含む反応容量100 $\mu$ lの当初溶液中で増幅し、か  
つ蒸発を防ぐため約100 $\mu$ l厚の鉱油で被覆した。

各DNA試料につき、1サイクルが次の3ステ  
ップから成る増幅のための15サイクルを行つた。  
(1) 2分間95°Cで熱ブロックセット中で変性す  
る。

(2) 熱ブロックセットを直ちに30°Cに移し2分間  
プライマーとゲノムDNAがアニーリングする  
ようにする。

(3) EコーリーDNAポリメラーゼIのクレノー  
断片(ニューイングランドバイオラブ)5単位  
とデオキシATP、デオキシCTP、デオキシ  
GTP及びTTPそれぞれ1ナノモルを含む $\mu$ l  
の溶液(10mMトリス(pH 7.5)、50mMNaCl、  
10mMMgCl<sub>2</sub>、及び4mMジチオスレイトール  
から成る緩衝液中)を加える。この伸長反応を  
30°Cにて10分間行つた。

最後のサイクルの後、95°Cに2分間維持して  
反応を停止させた。鉱油は0.2mlのクロロフォ  
ルムで抽出して廃棄した。最後の反応液の容量  
は130 $\mu$ lであつた。

プローブ及びDdeI/HinfIによる増幅した  
ゲノムDNAのハイブリダイゼーション/消化  
25マイクロリットルの増幅されたゲノムDNA  
をエタノールで沈殿させ、同量のTE緩衝液中に  
再懸濁した。10マイクロリットル(154ngのゲノ  
ムDNAと同等の前増幅体を含む)を1.5mlのマイ  
クロフュージ管に入れ、そして20 $\mu$ lのTE緩衝  
液により最後の容量を30 $\mu$ lとした。試料を鉱油  
で被覆して95°Cで10分間変性した。ラベルされた  
RS06プローブ0.02ピコモルを含む0.6MNaCl10  
マイクロリットルを管に加え、穏やかに混合し、  
直ちに56°Cの熱ブロックに移して1時間おいた。  
ラベルしていないRS10ブロッキングオリゴマー  
4マイクロリットル(0.8ピコモル)を加え、更  
に10分間同じ温度でハイブリダイゼーションを続  
けた。5マイクロリットルの60mMMgCl<sub>2</sub>/0.1  
%BSA及び1 $\mu$ lのDel I(10単位、ニューイング

ランドバイオラブ)を加え、再アニーリングされたDNAを56℃で30分間消化した。1マイクロリットルのHinf I (10単位、ニューイングランドバイオラブ)を加え、更に30分インキュベートした。4μℓの75mMEDTAと6μℓのトラッキング染料を最終容積が61μℓになるように反応混合物に加えて反応を終了した。

鉱油を、2mlのクロロフォルムで抽出し、18μℓの反応混合物(45nmのゲノムDNA)をヘーファ-SE200装置中の30%ポリアクリルアミドのミニゲル(19:1、バイオラド)に負荷した。このゲルをプロモフェノールブルー染料の前端が当初の位置から3.0cm動くまで約300ボルトで1時間電気泳動させた。該ゲルの前端の1.5cmは取り除かれ、残りのゲルは4日間-70℃で強化スクリーンはされる。

#### 写真の検討(第9図)

各レーンは45ngの増幅されたゲノムDNAを含んでいる。レーンAはMol4DNAを、レーンBはCH12を、レーンCはSC-1を、又レーンDはGM2064を含んでいる。Molt4は、細胞当たり2コピーのβ<sup>s</sup>遺伝子を有する正常の個体の遺伝子型CAAであり、CH12は、細胞当たり1個のβ<sup>s</sup>と1個のβ<sup>+</sup>遺伝子を有する鎌状細胞キャリアからの臨床用試料(AS)であり、そしてSC-1は細胞当たりコピーのβ<sup>s</sup>を有する鎌状血球血貧血個体の遺伝子型を意味する。GM2064はβ-又はδ-グロビン配列を含有せず、ネガティブ対照として存在する。

写真から分かるようにDde Iで開裂された、β<sup>s</sup>特異的であるオクタマーはβ<sup>s</sup>遺伝子を含むDNAにのみ存在し(レーンA及びB)、Hinf Iで開裂された、β<sup>s</sup>特異性を有するトリマーは、β<sup>s</sup>遺伝子を含むDNAにのみ存在する(レーンB及びC)。トリマー及びオクタマーの両者の存在(レーンB)は鎌状赤血球血貧血キャリアを示すものであり、オクタマーのみを生ずる正常の個体(レーンA)及びトリマーのみを示す鎌状赤血球血貧血にかかっている個体(レーンC)から区別される。

比較のため、上記実験を増幅されていないゲノムDNAを用いて繰り返し行い、増幅を行うと検出感度が少なくとも1000倍増加することが分かった。

#### 実施例 6

本実施例は、ラベルされたプローブを使用することなく全ヒトDNA中の全く精製されていない単一コピー遺伝子をゲル上で直接検出する方法を示すものである。

実施例3に記載した技術を用い、β-グロビン遺伝子の第1エクソン中の配列からの110塩基対断片を、全ヒトDNA10マイクログラムから20サイクルで増幅した。この20サイクル後に生産される110塩基対断片は、臭化エチジウムにより容易に染色されてゲル上で見る事ができた。

配列は、最初に制限酵素Dde Iにより切断されると、配列がβ-グロビンのS対立遺伝子中における場合のように酵素により認識される制限部位を含まないものでない限り、増幅されなかつた。

#### 実施例 7

A.ヒトβ-グロビンA対立遺伝子からの1.9kb挿入部を含有する合計100フェムトモルのpBR328、500Ci/モルである各α-<sup>32</sup>P-デオキシNTPを50ナノモルずつ、及び実施例3で使用した各プライマー1ナノモルを、100μℓの30mMトリス-アセテート(pH7.9)、60mM酢酸ナトリウム、100mMジチオスレイトール及び10mM酢酸マグネシウムを含む溶液中に溶かした。この溶液を100℃にして2分加熱し、25℃にて1分冷却した。4.5単位のE.コリー-DNAポリメラーゼI及び0.09単位の無機ピロフオスファターゼを加えて反応混合物中でピロリン酸が生ずるのを防止し、その後反応を25℃で2分間進行させ、更に加熱、冷却、酵素の添加及び反応のサイクルを9回繰り返した。各合成サイクルの後、10μℓのアリコートを取り出し1μℓの600mMEDTAに加えた。それぞれを、90mMのトリスポレート及び2.5mMのEDTA中、pH8.3で14%のポリアクリルアミドゲル上で24ボルト/cm、2.5時間で分析した。操作の終了したゲルは、0.5μg/mlの臭化エチジウムを加えた同じ緩衝液に20分浸し、当初の緩衝液で洗浄し、赤フィルターを用いて紫外線中で写真を撮影する。

生産された110塩基対断片は紫外線ブゲルから切り出し、そしてクレンコフ放射により係数した。Nがサイクル数を意味し、yがサイクル毎の部分的収率である式

$$\text{pmoles}/10\mu\ell = 0.01(1+y)^N - yN - 1,$$

にデータを一致させようとする試みは、yが

35

0.619であるときに楽観的なものとなる。これは、十分な増幅が起こっていることを暗示している。

B. 各デオキシNTPを100ナノモルずつ100 $\mu$ lの反応溶液に加え、放射性ラベルを行わず、各サイクル毎に液を取り出さなかつた以外は、上記と同じ実験を繰り返した。10サイクル後に反応物を2分間沸騰させて反応を停止させ、57°C、1時間で再ハイブリダイゼーションを行った。

110塩基対生成物の配列を、その8 $\mu$ lのアリコート  
を、1 $\mu$ lのウシ血清アルブミン (5 mg/ml) と\*

d(TTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCCTACTAGC) 及び

d(GOCTCACCACTTCATCCACGTTCCACC)

B 次のプライマーを用いたこと以外は実施例 7Aと同じように実験を繰り返してpBR328の262塩基対断片を調製した。反応時間はサイクル当たり20分であつた。

d(GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG)

及び

d(TGGTCTCCTTAAACCTGTCTTG)

C ヒト $\beta$ -グロビンS対立遺伝子からの1.9kbの挿入部を含む、100フェムトモルのpBR328のMstII消化物を当初の鋳型として用いた以外は、実施例8Bと同様に実験を行った。該プラスミドはMstIIにより数回切断されたが、増幅すべき配列の内側では切断が起こらなかつた。更に、使用したプライマーは次の通りで、240塩基対断片を生産した。

d(GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG) 30

及び

d(TAACCTTGATACCAACCTGCCC)

D 100フェムトモルのpBR322のNru I消化物を鋳型として用い、100 $\mu$ lの反応液中で各デオキシNTPを200ナノモル使用し、次のプライマーを使用してpBR322から500塩基対断片を生産した以外は実施例7Bと同様に実験を行った。

d(TAGGCGTATCAAGAGGCCCT) 及び

d(CTTCCCATCGGTGATGTGG)

反応時間は37°Cでサイクル当たり20分であつた。最後の再ハイブリダイゼーションは57°Cで15時間を行った。電気泳動は4%アガロースゲル上で

36

\*1 $\mu$ lの好適な制限酵素 (HinfI, Mnl I, MstII, Nco I) を加えて制限分析し、37°Cで15時間反応させて確認した。PAGEは、上述の通り行った。

#### 実施例 8

5 本実施例は、pBR328とpBR322の種々の断片を増幅するために異なつたプライマーを使用する例を示す。

A 次のプライマーを使いpBR328の130塩基対断片を調製すること以外は実施例7Aと同じように実験を繰り返した。

15 行つた。

#### 実施例 9

本実施例は、インヒドロ変異が増幅されたセグメントに導入されるような本発明方法を例示するものである。

20 A Nru Iで直線化したpBR322合計100フェムトモル、1ナノモルの75塩基対断片を生成するように設計されたそれぞれ次式

d(CGCATTAAAGCTTATCGATG) 及び

d(TAGGCGTATCAAGAGGCCCT)

25 のプライマー、それぞれ100ナノモルの各デオキシNTPを、pH 8の40mMのトリス、20mMMgCl<sub>2</sub>、5mMのジチオスレイトール及び5 mg/mlのウシ血清アルブミンの溶液100 $\mu$ l中で混合した。この混合物を100°Cにして1分間加熱し、水浴中23°C、0.5分間冷却し、次に45単位のクレノー断片と0.09単位の無機ピロフォスファターゼを加え、反応を3分間行つた。加熱、冷却、酵素添加及び反応サイクルを9回繰り返した。10回目の反応サイクルは凍結により終了させ、反応混合物のアリコート8 $\mu$ lを4%アガロースゲルに適用し、臭化エチジウムにより視覚化した。

B オリゴヌクレオチドプライマーとして次式のものを使用した以外は実施例9Aと同様の実験を繰り返した。

d(CGCATTAAAGCTTATCGATG) 及び

d(AATTAATAAGACTCACTATAGGGAGATAGGCGTATCAGAGGCCCT)

37

これらのプライマーは101塩基対を生産するように設計され、その(2番目のプライマー中の) 26ヌクレオチドはpBR322には存在しない。これらのヌクレオチドはT7プロモーターの配列を表すもので、これを、pBR322からの75塩基対配列に、20の相補的塩基と26塩基の5'側伸長部とを有するプライマーを使用して連結した。この方法は2時間より少ない時間で実施することができ、100フェムトモルのpBR322から比較的純粋な101塩基対断片2ピ

コモルを生産することができた。  
T7プロモーターはRNA転写を開始させるために使用できる。T7ポリメラーゼを101塩基対\*

d(AATTAATACGACTCACTATAGGGAGATAGGCGTATCACGAGGCCCT)

使用して1026対断片を調製した。2番目のプライマー26ヌクレオチドはpBR322には存在せず、上記のT7プロモーターを示すものである。このプロモーターは、pBR322からの1000塩基対断片に隣接して挿入された。

これらの結果は、鋳型鎖と完全にマッチしていないがそれにもかかわらず十分にハイブリダイズして酵素的に伸長するプライマーは、当初の鋳型に対応する鎖よりむしろプライマーの鎖を含む長鎖生成物を生成せしめるということを暗示する。長鎖生成物はインビトロ変異を生じさせる第2のプライマー用の鋳型としての役割を果たす。その後のサイクルでは、更に多くのミスペアしたプライミングが要求されないで、効率が減少することなくこの変異は増幅される。この場合その5'末端に相補的でない伸長部分があるプライマーが、複製されるべき鋳型に隣接して生成物に新しい配列を挿入するために使用された。

#### 実施例 10

本実施例は単コピー遺伝子を増幅させる際にバックグラウンドを減少させるためにネスト状に\*

d(CCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTCC)

これらは、上記で生産された110塩基対断片中に含まれる58塩基対断片を増幅した。増幅すべき最後の10回のサイクルは、10 $\mu$ lのアリコートをし、上記した各デオキシNTP100ナノモルと各プライマー200ピコモルを含む90 $\mu$ lの新しいトリスアセテート緩衝液に希釈することにより達成する

38

\* 断片に加えて単鎖RNAを生成せしめることができる。

C オリゴヌクレオチドプライマーとして下記のものを使用して、pBR322から1000塩基対断片を調製した以外は実施例8Dと同様に実験を繰り返した。

d(TAGGCGTATCACGAGGCCCT) 及び  
d(CCAGCAAGACGTAGCCACG)

D 上記9Cと同様の実験を繰り返した。但し、オリゴヌクレオチドプライマーとして下記のもの、

d(TAGGCGTATCACGAGGCCCT) 及び

\*(nested) セットしたプライマーを使用することを例示するものである。

野性型 $\beta$ -グロビン対立遺伝子についてホモ接合体である全ヒトDNAに対して、20サイクルの増幅を次のように行つた。10 $\mu$ gのDNA、それぞれ200ピコモルの次式のプライマー、

d(ACACAACTGTGTTCCTACTAGC) 及び  
d(CAACTTCATCCACGTTTCACC)

並びに100ナノモルずつのdNTPを、100 $\mu$ lの30mMトリスアセテート、60mMの酢酸ナトリウム、10mMのジチオスレイトール、及び10mMの酢酸マグネシウム中で100 $^{\circ}$ Cにて1分間加熱し、25 $^{\circ}$ Cに1分間下げて、そして2単位のクレノー断片とともに2分間処理した。加熱、冷却、クレノー試薬の添加のサイクルを19回繰り返した。10 $\mu$ lの液体を反応混合物から取り出し、更に10回の増幅のためのサイクルを次の各プライマーを用いて行つた。

d  
(CAGACACCATGGTGCACCTGACTCCTG) 及び

ことができる。反応条件は上記の通りとした。10サイクルの後10 $\mu$ lのアリコート(当初のDNAの100ナノグラムに対応)を6%のNuシーブ(FMC社)アガロースゲルに加え、臭化エチジウムを使つて視覚化した。

第10図は、紫外線で発光させた従来法の通り

39

赤いフィルターを通して写真撮影した上記ゲルを示すものである。レーン 1 は分子量のマーカーである。レーン 2 は上記反応のアリコートである。レーン 3 は当初の野性型 DNA が増幅の前に Dde I により開裂されたこと以外は上記したものと同じ反応のアリコートである。レーン 4 は鎌状赤血球貧血  $\beta$ -グロビン対立遺伝子についてホモ接合体であるヒト DNA を増幅の前に Dde I で処理したこと以外は上記と同様な反応のアリコートである (鎌状赤血球貧血対立遺伝子は増幅される断片内に Dde I 部位を含まない)。レーン 5 は鮭の精子 DNA でヒト DNA を置き換えた以外は上記と同様な反応のアリコートである。レーン 6 は増幅後反応液を Dde I で処理したこと以外は上記と同様な反応のアリコートである (Dde I は 58 塩基対の野性型生成物を 27 塩基体及び 34 塩基体の断片に変換する)。レーン 7 は増幅後 Dde I で処理したレーン 4 の材料のアリコートである (58 塩基対の鎌状赤血球貧血生成物は Dde I を含まない)。

アガロースゲルの臭化エチジウム染色のみを使用してヒト DNA の 1 マイクログラムからの単コピー遺伝子を代表する 58 塩基対断片を検出するためには、約 500000 倍に増幅することが必要である。これは、ここで 2 つのオリゴヌクレオチドのネスト状セットを使用して達成することができる。第 1 のセットは 110 塩基対断片を増幅し、内部のネスト状セットは、第 10 図に示すように便利に検出できるレベルになるまでこの生成物のサブ断片を増幅する。先行する増幅工程で増幅された配列中に含まれ、又他のプライマーの伸長生成物中にも含まれるより小さな配列をプライマーを使つて増幅する本法は、例えばコナーらの PNAS 80 巻 278 頁 (1983 年) 及びレアリーの PNAS 80 巻 4045 頁 (1983 年) に記載されているように放射性同位体又は非放射性同位体プローブのハイブリダイゼーションの方法論に頼ることなく、 $\beta$ -グロビンの座における野性型を鎌状赤血球貧血対立遺伝子から区別することを可能にする。

#### 実施例 11

本法は患者の DNA 試料中の例えばクラミジアのような伝染性疾患と関連する特定の配列を、所望の増幅された配列を含むピオチン化されたハイブリダイゼーションプローブを使用しかつ前述の

40

米国特許第 4358535 号に記載された方法を使用して検出する際に有用であることが期待される。ピオチン化されたハイブリダイゼーションプローブは、一部が二重鎖となつた DNA に、次式のスパーアームを介してピオチンに結合した 4'-メチレン置換-4, 5, -8-トリメチルプソレンを挿入しかつ光を照射することにより調製することができる。



式中 R は -H 又は CHO 基であり、R' は -H であり、x は 1~4 の数であり、そして y は 2~4 の数である。プローブ上のピオチニル基の検出は、エンゾバイオケム社により市販されているストレプタビジン-酸性フォスファターゼ複合体を用いて、パンフレットに製造者が示している検出方法により達成することができる。ハイブリダイゼーションプローブは、検出用複合体との結合、及びそれに続く酸性ホスファターゼにより触媒される反応 (この反応が沈澱性色素を生成する) に基く沈澱した染色スポットとして見る事ができる。

#### 材料の寄託

細胞系 SC-1 (CTCC#0082) は、1985 年 3 月 19 日、米国、20852、メリーランド州ロックビルパークロンドライブ 12301 に所在するアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC) に ATTT 受理番号第 CRL8756 号として寄託された。SC-1 の寄託は、ATCC と本特許出願人のシータス・コーポレーションとの間の契約に従つて行われた。ATCC との契約は、本寄託を記載しかつ特定する米国特許が発行された場合又は米国又は外国特許出願が公衆に公告された場合又は公開された場合のいずれか早い方が来たときにこの細胞系の子孫を公衆がそれを永続的に利用できるようにするために提供し、更に本細胞系を利用させることについては、米国特許商標局長官が米国特許法第 122 条及びそれに関する長官のルール (37CFR1、14 条も特に 886OG638 に関連して含む) に従つて権限を持つて決定した人間に対しても行う。本出願の譲受人はもし寄託した細胞系が好適な条件下で培養したにもかかわらず、死滅し、失われ、損傷したときは通知を受けてか

ら迅速に同じ細胞系の育成培養基と置き換えることに同意する。

纏めると、本発明はまず1つ又はそれ以上の特定の核酸を、プライマーの伸長により生産される生成物が引き続き次のプライマーの伸長反応の鋳型としての役割を果たすような連鎖反応を用いて増幅させることにより核酸中の配列を検出するようにした方法を提供する。本法は当初にほんの僅かの量しか含まれていない核酸配列を検出するために特に有用である。更に増幅法は分子クローニングにも使用することができる。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、増幅されることが望まれるヒトβ-グロビンの94塩基対長の配列を示すものであり、鎌状赤血球貧血に伴う単一塩基対変化を94merの下方に描いてある。第2図は、ヒトの野生型DNA中、及び正常のβ-グロビン遺伝子の1.9kbのAamHI断片を含むプラスミド(pBR328:HbAと示される)中に含まれる上記94merの増幅を示す臭化エチジウムで染色されたポリアクリルアミドのゲルの写真である。第3図は、pBR328:BbA、及びβ-グロビンの鎌状赤血球貧血対立遺伝子の1.9kbのBamHI断片を含有するプラスミド(pBR328:HbSと称する)中に存在する特定の標的94mer配列のいずれかの増幅を示すポリアクリルアミドゲル電気泳動のオートラジオグラフを示し、pBR328:HbAでは増幅されるべき配列がMst IIにより開裂され、そしてpBR328:HbSでは増幅されるべき配列が処理されたMst IIにより開裂されなかつた。第4図は、2つのオリゴヌクレオチドプライマーを用いる3サイクルについて、ヒトβ-グロビンの所望の

94mer、配列の増幅のためのポリメラーゼ連鎖反応のステップと生成物の詳細を示すものである。第5図は、pBR328:HbA中の240mer配列の4サイクル後の増幅を示す臭化エチジウムで染色されたポリアクリルアミドのゲルを示す写真であり、ここはアリコートがNCo I(レーン3)、Mst II(レーン4)又はHinf I(レーン5)により消化される。レーン1は分子量の基準で、レーン2は無傷の240bpの生成物を含んでいる。第6図は、Pde I及びHinf I制限部位間にある正常な(β<sup>A</sup>)β-グロビン遺伝子及び鎌状赤血球(β<sup>S</sup>)β-グロビン遺伝子の配列を示すもので、β<sup>A</sup>についての1本線はDde I部位(CTGAG)の位置を示し、β<sup>A</sup>及びβ<sup>S</sup>についての2重線はHinf I部位(GACTC)の位置を示している。第7図は、40merプローブ、並びにDde I及びこれに続くHinf I制限酵素を用いる正常β-グロビンの逐次的な消化の結果を示すものである。第8図は、第7図と同じ40merプローブ並びにDde I及びこれに続くHinf I制限酵素を使用する鎌状β-グロビンの逐次的な消化の結果を示すものである。第9図は、この発明の増幅にかけられた全ヒトDNAの試料中に存在するβ-グロビン対立遺伝子を特異的に特徴付けるための、第7図と同じ40merプローブの使用を示す、臭化エチジウムで染色されたポリアクリルアミドのゲルを示す写真である。第10図は、臭化エチジウムを紫外線を用いて視覚化した6%のNuシーブアガロースゲルの写真を示すものである。この写真は、110-bp増幅生成物のサブフラグメントの増幅を示し、このサブフラグメントは110bp断片内の内部ネストである。

FIG.1

2 重鎖 94 - bp 配列

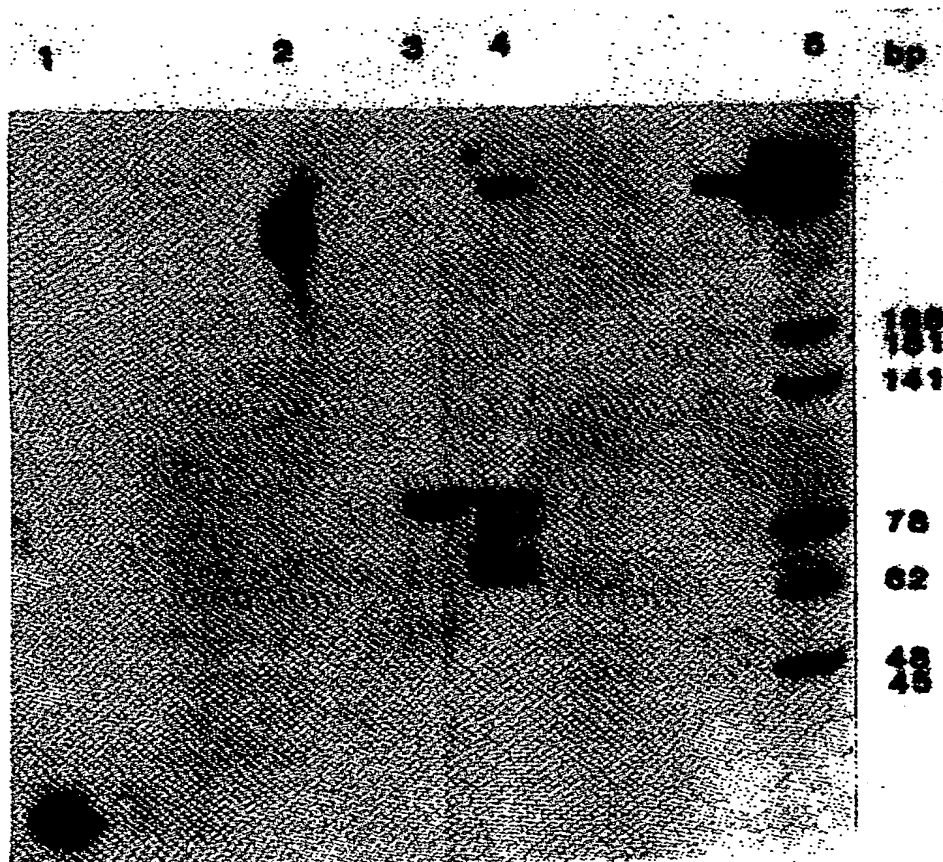
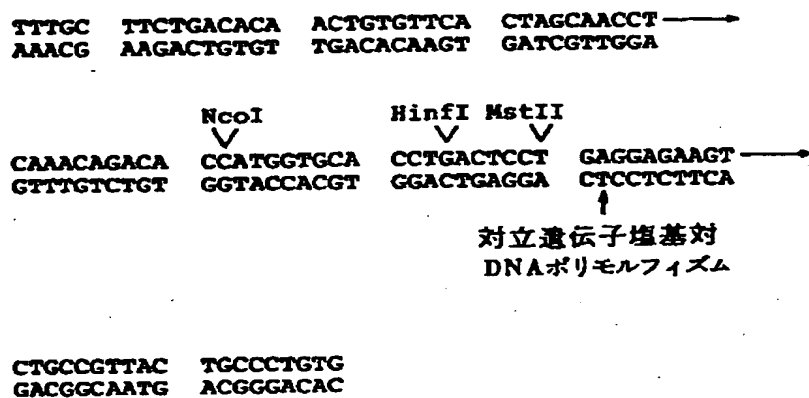


FIG.2

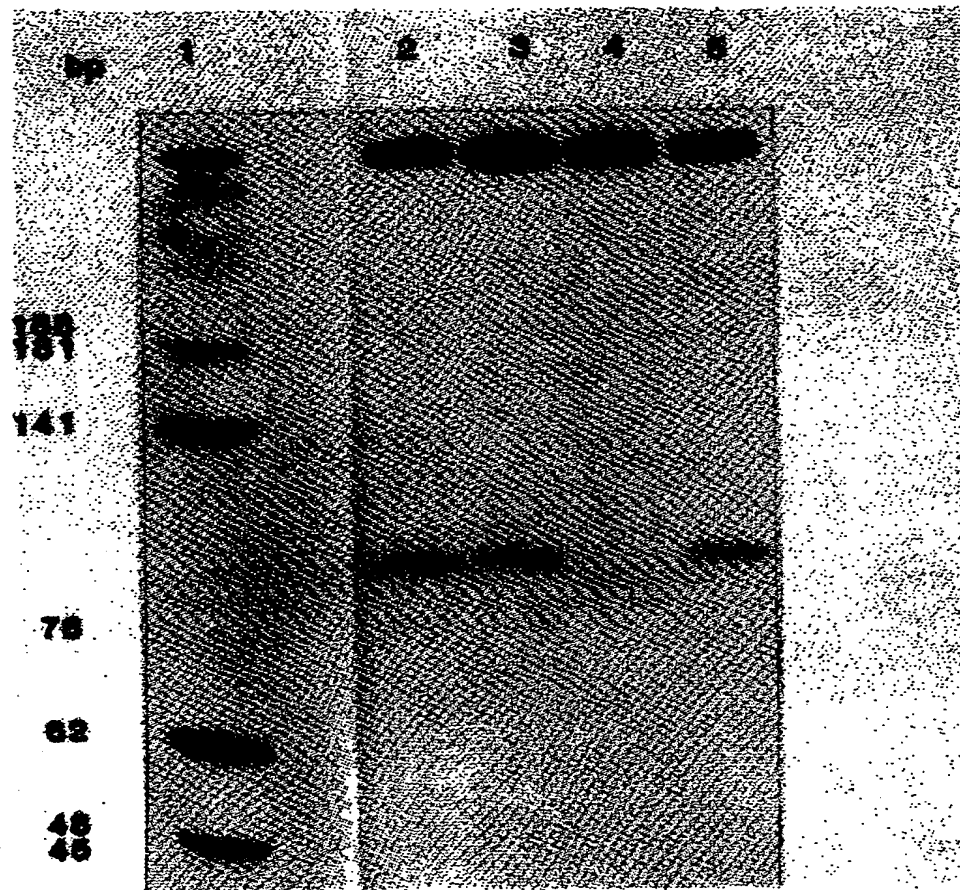


FIG.3

FIG. 6

$\beta^A$  CATGGTGCACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAA  
 GTACCACGTGGACTGAGGACTCCTCTTCAGACGGCAATGACGGGACACCCCGTTCCACTT

$\beta^S$  CATGGTGCACCTGACTCCTGTGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAA  
 GTACCACGTGGACTGAGGACACCTCTTCAGACGGCAATGACGGGACACCCCGTTCCACTT

★ 印は、鎌状赤血球貧血遺伝子中の Dde I 部位を中断する変異 (A → T)



FIG. 4-1

ヒト-β-グロビン

0 ... CCGCTGCTG CTTGCTGCTG CTTGCTGCTG ACTGCTGCTG ACTGCTGCTG TGGCTGCTG TGGCTGCTG CTTGCTGCTG GCGCTGCTG AGTCTGCTG...  
 101 111 121 131 \*\*\* 141 151 161 171 181 191 201 211 221

0 ... GGTGCTGCTG GAGCTGCTG GAGCTGCTG TGGCTGCTG TGGCTGCTG ACTGCTGCTG ACTGCTGCTG AGGCTGCTG GCGCTGCTG CCGCTGCTG TGGCTGCTG...  
 CAGCTGCTGCTG PC01  
 TGGCTGCTGCTG PC02

変性, 再了ニ-ル

0 ... CCGCTGCTG CTTGCTGCTG CTTGCTGCTG ACTGCTGCTG ACTGCTGCTG TGGCTGCTG TGGCTGCTG CTTGCTGCTG GCGCTGCTG AGTCTGCTG...  
 5' PC02 TTG CTTGCTGCTG A → 伸長  
 111 121 131 141 151 161 171 181 191 201 211 221

伸長 ← GAGCTGCTG 5' PC01

ポリメラ-化 完了

0 ... CCGCTGCTG CTTGCTGCTG CTTGCTGCTG ACTGCTGCTG ACTGCTGCTG TGGCTGCTG TGGCTGCTG CTTGCTGCTG GCGCTGCTG AGTCTGCTG...  
 1 ... GGTGCTGCTG GAGCTGCTG GAGCTGCTG TGGCTGCTG TGGCTGCTG ACTGCTGCTG ACTGCTGCTG AGGCTGCTG GCGCTGCTG CCGCTGCTG TGGCTGCTG...  
 TTG CTTGCTGCTG ACTGCTGCTG ACTGCTGCTG TGGCTGCTG TGGCTGCTG ACTGCTGCTG ACTGCTGCTG AGGCTGCTG GCGCTGCTG CCGCTGCTG TGGCTGCTG...  
 111 121 131 141 151 161 171 181 191 201 211 221

変性, 再了ニ-ル

0 ... CCGCTGCTG CTTGCTGCTG CTTGCTGCTG ACTGCTGCTG ACTGCTGCTG TGGCTGCTG TGGCTGCTG CTTGCTGCTG GCGCTGCTG AGTCTGCTG...  
 5' PC02 TTG CTTGCTGCTG A → 伸長  
 111 121 131 141 151 161 171 181 191 201 211 221

伸長 ← GAGCTGCTG 5' PC01

1 ... GGTGCTGCTG GAGCTGCTG GAGCTGCTG TGGCTGCTG TGGCTGCTG ACTGCTGCTG ACTGCTGCTG AGGCTGCTG GCGCTGCTG CCGCTGCTG TGGCTGCTG...  
 TTG CTTGCTGCTG ACTGCTGCTG ACTGCTGCTG TGGCTGCTG TGGCTGCTG ACTGCTGCTG ACTGCTGCTG AGGCTGCTG GCGCTGCTG CCGCTGCTG TGGCTGCTG...  
 111 121 131 141 151 161 171 181 191 201 211 221

伸長 ← GAGCTGCTG 5' PC01

0 ... CCGCTGCTG CTTGCTGCTG CTTGCTGCTG ACTGCTGCTG ACTGCTGCTG TGGCTGCTG TGGCTGCTG CTTGCTGCTG GCGCTGCTG AGTCTGCTG...  
 5' PC02 TTG CTTGCTGCTG A → 伸長  
 111 121 131 141 151 161 171 181 191 201 211 221

伸長 ← GAGCTGCTG 5' PC01







FIG.5

FIG.9

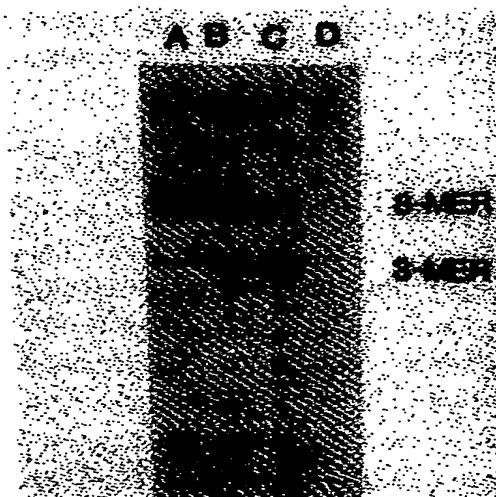


FIG. 7

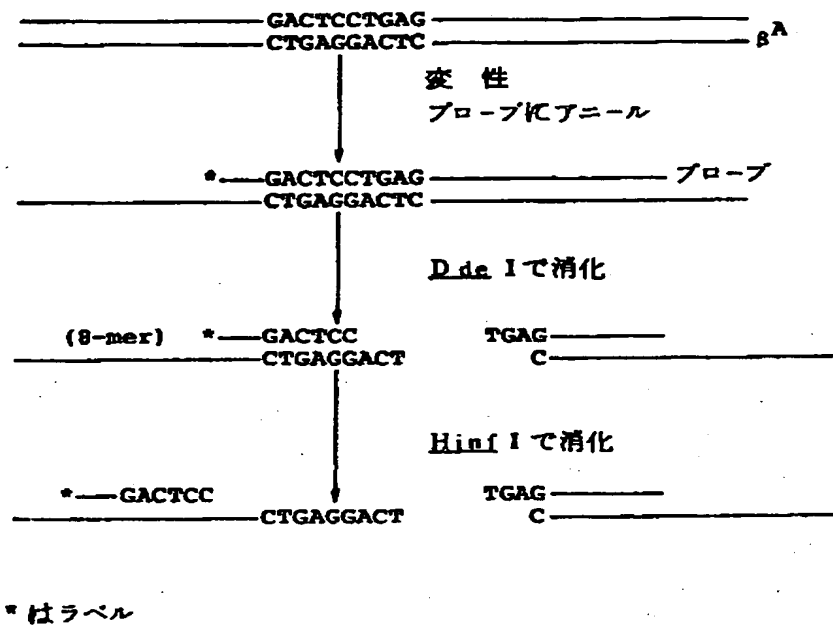


FIG. 8

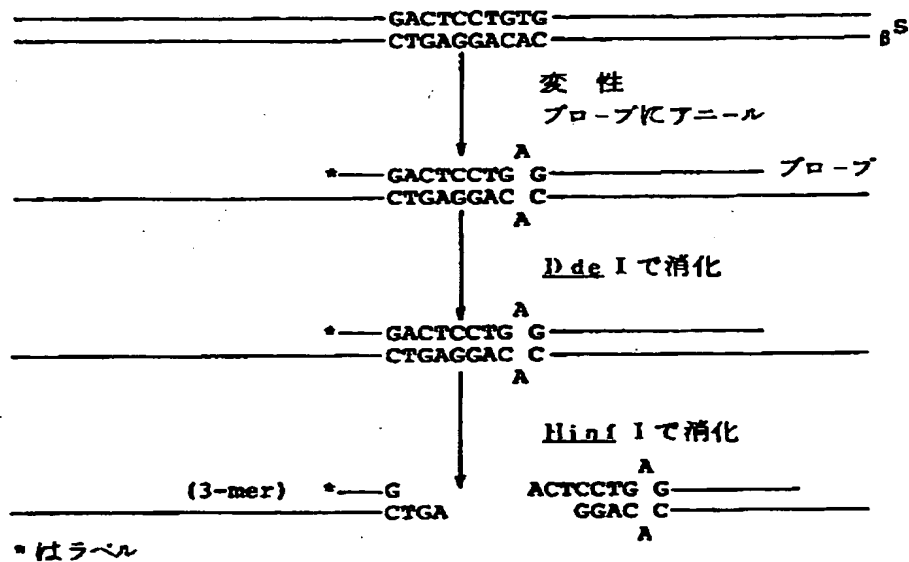


FIG. 10

